

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Universitas Katolik Widya Mandira Kupang, selama waktu 4 bulan (September-Desember 2019). Ekstraksi, skrining fitokimia, kromatografi lapis tipis, kromatografi kolom dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Katolik Widya Mandira Kupang. Identifikasi terhadap senyawa aktif dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometer Infra Merah di Laboratorium Material Maju Universitas Negeri Malang.

3.2 Tempat Pengambilan Sampel

Sampel dari penelitian yaitu kulit batang tumbuhan Halay (*Alstonia Spectabilis R. Br*) diambil dari Desa Wee Rame, Kabupaten Sumba Barat Daya.

3.3. Bahan danAlat

3.3.1 Bahan

3.3.1.1 Bahan Uji

Tanaman yang diteliti adalah Halay (*Alstonia Spectabilis R. Br*) yang diperoleh dari Desa Wee Rame, Kabupaten Sumba Barat Daya. Bagian tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang tumbuhan Halay (*Alstonia Spectabilis R. Br*).

3.3.1.2 Bahan kimia

Bahan kimia yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah n-heksana, metanol, aquaedes, asam tartrat 2%, amoniak, asam asetat anhidrat, kloroform, H₂SO₄ pekat, logam magnesium, larutan HCl 1%, pereaksi Liebermann Buchard (asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat), pereaksi Mayer (HgCl₂, KI, aquades), pereaksi Wagner (aquades, iodin dan kalium iodida), pereaksi Dragendorff (BiNO₃, HCl pekat, KI, aquades), FeCl₃ 1%, Silika gel₆₀, es batu, aquades.

3.3.2 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat Spektrofotometer UV-Vis Thermo Scientific, seperangkat alat Spektrofotometer Infra Merah Shimadzu, lampu UV 254 nm dan 366 nm, alat kromatografi kolom, seperangkat alat evaporasi (vacum rotary evaporator), oven, desikator, plat KLT, gelas kimia, gelas ukur, labu ukur, erlenmeyer, corong, pipet tetes, batang pengaduk, timbangan analitik, tabung reaksi, rak tabung reaksi, botol vial, spatula, kertas saring, aluminium foil, blender, gunting, pensil dan mistar.

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Pengumpulan dan Preparasi Sampel

Penyiapan sampel dilakukan dengan mengumpulkan bagian kulit batang tumbuhan Halay (*Alstonia Spectabilis R. Br*), kemudian dipotong kecil-kecil dan dikeringkan. Proses pengeringan sampel dengan menjemur dibawah cahaya matahari. Kemudian sampel yang telah kering dihaluskan dengan blender untuk memperoleh sampel yang berupa serbuk.

3.4.2 Pembuatan Ekstrak

Sebanyak 200 gram sampel serbuk halus kulit batang tumbuhan Halay (*Alstonia Spectabilis R. Br*) direndam dengan 500 mL n-heksana selama 24 jam. Sampel kemudian dikocok selama 30 menit. Langkah ini dilakukan selama 3 kali. Kemudian maserat ini diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental n-heksana dan ditimbang beratnya.

Residu dari maserasi n-heksana yang telah bebas lemak direndam dengan 500 mL metanol selama 24 jam, kemudian dikocok selama 30 menit. Perendaman dengan metanol dilakukan sebanyak 3 kali. Kemudian maserat diuapkan dengan alat *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental metanol dan ditimbang beratnya.

3.4.3 Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan terhadap kulit batang tumbuhan Halay (*Alstonia Spectabilis R. Br*). Sebanyak 2 gram ekstrak kental ditambahkan masing-masing 5 mL air suling dan kloroform lalu dikocok kuat dan dibiarkan beberapa saat sampai

terbentuk dua lapisan. Lapisan air digunakan untuk uji senyawa flavanoid, fenolik dan saponin. Lapisan kloroform digunakan untuk uji senyawa terpenoid dan steroid. Sedangkan untuk uji alkaloid memiliki prosedur tersendiri.

a. Uji Flavanoid

Beberapa tetes lapisan air pada plat tetes ditambah 1-2 butir logam magnesium dan beberapa tetes asam klorida pekat. Terjadinya warna jingga, merah muda sampai merah menandakan adanya senyawa flavanoid.

b. Uji Fenolik

Beberapa tetes lapisan air pada plat tetes ditambah 1-2 tetes larutan besi(III) klorida 1%. Bila terbentuk biru/ungu, berarti terdapat senyawa fenolik.

c. Uji Saponin

Lapisan air dalam tabung reaksi dikocok. Apabila terbentuk busa yang bertahan selama 5 menit, berarti positif adanya saponin.

d. Uji Terpenoid dan Steroid

Lapisan kloroform disaring melalui pipet yang berisi norit. Hasil saringan dipipet 2-3 tetes dan dibiarkan mengering pada plat tetes. Setelah kering ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard (2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat). Terbentuknya warna merah berarti positif adanya terpenoid dan warna hijau-biru berarti positif adanya steroid.

e. Uji Alkaloid

Pemeriksaan alkaloid, digunakan metode Culvenor-Fitzgerald dimana ekstrak kulit batang tumbuhan Halay (*Alstonia Spectabilis R. Br*) sebanyak 1 gram, ditambahkan 3 mL kloroform, kemudian ditambahkan 3 mL larutan kloroform

beramoniak 0,05 M, diaduk kemudian disaring. Kedalam tabung reaksi ditambahkan 1 mL asam sulfat 2 N, kocok selama 2 menit, biarkan hingga terbentuk 2 lapisan dan terjadi pemisahan. Ambil lapisan asam (atas) dan tambahkan 1-2 tetes pereaksi Mayer. Jika terbentuk endapan putih dengan pereaksi Mayer menunjukkan hasil yang positif untuk alkaloid, atau dengan menggunakan pereaksi Dragendorff akan terbentuk warna jingga.

3.4.4 Pengujian dengan Kromatografi Lapis Tipis

Tiap-tiap ekstrak kental n-heksana dan metanol diKLT untuk menentukan jumlah komponen dalam ekstrak tersebut. Banyaknya komponen ditandai dengan banyaknya noda yang dihasilkan pada plat KLT. Selain untuk menentukan banyaknya komponen juga digunakan untuk mencari eluen dalam pola pemisahan yang bagus pada ekstrak n-heksana dan metanol.

3.4.5 Pemisahan Senyawa Alkaloid

Ekstrak metanol yang diperoleh diasamkan dengan asam tartrat 2% sampai pH 3-4, kemudian diuji dengan pereaksi Dragendorff dan selanjutnya lapisan asam dibasakan dengan larutan amonia sampai pH 9-10, partisi dengan kloroform untuk mengikat alkaloid sampai lapisan basanya negatif alkaloid yang diketahui dengan cara uji Dragendorff, lapisan kloroform yang mengandung alkaloid dicuci dengan aquadest dan dikeringkan dengan sodium sulfat anhidrat kemudian dipisahkan, lapisan kloroform diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kloroform. Ekstrak alkaloid ini dipersiapkan untuk dikromatografi kolom.

3. 4.6 Pemeriksaan Secara Kromatografi Lapis Tipis

Sejumlah komponen ekstrak kloroform ditentukan dengan KLT. Plat silika gel 60 GF₂₅₄ sebagai adsorben diaktifkan lebih dahulu dengan cara memanaskan dalam oven pada suhu 110 °C selama 30 menit. Tujuannya untuk menghilangkan air dalam silika gel. Sampel ditotolkan dengan pipa kapiler dengan jarak 1 cm dari ujung bawah plat. Ekstrak kloroform digunakan eluen kloroform:metanol dengan perbandingan (4,5:0,5; 4:1;3,6:1,7;3,6:1,6;3,6:1,5;3,6:1,4). Elusi sampai eluen naik kira-kira 1 cm dari ujung bawah plat, dikeluarkan dan dikeringkan. Untuk menentukan letak noda digunakan penampak noda lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan menyemprotkan pereaksi Dragendorff pada plat. Jika memberikan warna orange/ merah bata, pengujian menunjukkan hasil positif mengandung alkaloid.

3.4.7 Pemisahan dengan Kromatografi Kolom

Untuk memisahkan senyawa-senyawa yang ada didalam ekstrak alkaloid dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom. Kromatografi kolom diisi dengan silika gel 60 GF₂₅₄. Pengisian kolom dilakukan dengan membuat bubur silika terlebih dahulu, lalu dimasukkan ke dalam kolom dengan menggunakan corong, kemudian dielusi sampai kerapatan silika didalam kolom maksimum. Ekstrak yang akan dipisahkan preadsorpsi dan dimasukkan dalam kolom. Kemudian dielusi menggunakan pelarut kloroform:metanol. Pemisahan dilakukan dengan bantuan gaya gravitasi. Hasil pemisahan ditampung dalam botol vial dan diberi nomor

3.4.8 Pengujian hasil fraksinasi kromatografi kolom dengan KLT

Hasil pemisahan kromatografi kolom dilakukan uji KLT. Vial-vial yang akan diuji ini diambil setiap 5 vial, selanjutnya plat KLT diberi garis 1cm ditepi atas dan bawahnya, lalu masing-masing fraksi ditotolkan pada plat yang telah diberi nomor sesuai dengan nomor vial kemudian dielusi dengan eluen yang sesuai sampai garis atas plat KLT, plat dikeluarkan dan dikeringkan. Untuk melihat noda yang dihasilkan dapat dilakukan dengan penyinaran lampu UV dan pereaksi penampak noda Dragendorff. Selanjutnya ditentukan Rf dari masing-masing noda. Vial yang mempunyai harga Rf yang sama dapat digabungkan menjadi satu fraksi.

3.4.9 Karakterisasi

Karakterisasi struktur senyawa yang diperoleh dilakukan dengan analisa Spektrofotometri UV-Vis dan IR.